

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 21620131152477UDC

廈門大學

硕士学位论文

多囊卵巢综合征与环境内分泌干扰物的相关性分析及其致病机制的研究

Association between polycystic ovary syndrome and  
environmental endocrine disruptors: the pathogenetic  
mechanisms involved

郭致准

指导教师姓名: 王重刚教授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年月

答辩委员会主席:

评阅人:

2016 年 5 月

多囊卵巢综合征与环境内分泌干扰物的相关性分析及其致病机制的初步研究

郭致准

指导教师: 王重刚教授

厦门大学

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年月日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年月

# 目录

目录.....	I
CONTENTS.....	IV
摘要.....	VII
Abstract.....	IX
第一章前言.....	1
1.1 多囊卵巢综合征的现状 & 发病机理.....	1
1.1.1 多囊卵巢综合征的主要症状和发病情况.....	1
1.1.2 多囊卵巢综合征的发病机理.....	1
1.2 环境内分泌干扰物的种类和污染现状.....	2
1.3 EDCs 对人体健康的影响.....	3
1.3.1 EDCs 影响人体的途径.....	3
1.3.2 EDCs 对人体健康的危害.....	4
1.3.2 EDCs 的毒性作用机制.....	5
1.3.4 EDCs 暴露对 PCOS 的影响.....	5
1.4 本研究的目的、意义及主要内容.....	6
1.4.1 本研究的目的及意义.....	6
1.4.2 本研究的主要内容.....	6
第二章材料与方法.....	8
2.1 实验材料.....	8
2.2 主要仪器.....	8
2.3 主要药品与试剂.....	9
2.4 主要试剂配制.....	9
2.4.1 EDCs 测定有关药品试剂.....	9
2.4.2 Western blot 分析所需主要溶液.....	9
2.5 主要实验方法.....	10

2.5.1 血清中 EDCs 的测定 .....	10
2.5.2 基因芯片分析 .....	12
2.5.3 卵巢中总 RNA 提取 .....	12
2.5.4 1st cDNA 合成 .....	13
2.5.5 PCR 扩增 .....	13
2.5.6 PCR 产物的切胶回收 .....	14
2.5.7 实时荧光定量 PCR (Realtime-PCR, RT-PCR) 分析 .....	14
2.5.8 Western Blot 检测 .....	15
2.6 数据处理 .....	16
<b>第三章实验结果及分析 .....</b>	<b>17</b>
3.1 妇女流行病学调查结果 .....	17
3.2 血清中 EDCs 含量的测定结果 .....	19
3.2.1 方法学考察 .....	19
3.2.2 PCOS 患者与正常组 EDCs 含量的比较 .....	22
3.2.3 血清 EDCs 之间的相关性检测 .....	25
3.2.4 血清 EDCs 与流行病学调查资料的相关性 .....	25
3.2.5 血清 EDCs 浓度与 PCOS 患病的逻辑回归分析 .....	27
3.2.6 EDCs 与激素和代谢物质水平的相关性 .....	27
3.2.7 EDCs 与激素和代谢物质水平的线性回归分析 .....	30
3.3 暴露大鼠卵巢 RNA 基因芯片结果 .....	37
3.3.1 差异基因统计 .....	37
3.3.2 生物学过程和信号通路分析 .....	39
3.2.3 qPCR 验证 .....	42
3.2.4 Western blot 验证 .....	43
<b>第四章讨论 .....</b>	<b>45</b>
4.1 血清中 EDCs 含量 .....	45
4.2 EDCs 含量与 PCOS 的关系 .....	46
4.3 TBT 或 BPA 暴露的大鼠基因芯片结果分析 .....	47
<b>第五章结论和展望 .....</b>	<b>51</b>

<b>5.1 EDCs 暴露与 PCOS.....</b>	<b>51</b>
5.1.1 结论 .....	51
5.1.2 展望 .....	51
<b>5.2 大鼠动物模型实验.....</b>	<b>51</b>
5.2.1 结论 .....	51
5.2.2 展望 .....	52
<b>参考文献.....</b>	<b>53</b>
<b>致谢.....</b>	<b>59</b>

# CONTENTS

Content(in Chinses) .....	I
Content(in English) .....	IV
Abstract(in Chinnese) .....	VII
Abstract(in English) .....	IX
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1The state and etiologyof polycystic ovary syndrome .....	1
1.1.1 The etiology and hallmarks ofpolycystic ovary syndrome .....	1
1.1.2 The pathogenesis of polycystic ovary syndrome .....	1
1.2 The species and current situations ofendocrine disrupting chemicals .....	2
1.3 The impact of endocrine disrupting chemicalsexposure on human health ...	3
1.3.1 The pathway of human beings affected by endocrine disrupting chemicals .....	3
1.3.2 The toxicity of endocrine disrupting chemicals .....	3
1.3.2 The toxicity mechanisms of endocrine disrupting chemicals .....	4
1.3.4 The impact of endocrine disrupting chemicals exposureon endocrine disrupting chemicals .....	5
1.4 Purpose and content of thesis .....	5
1.4.1 The purpose and significanceof this study .....	5
1.4.2 The main content of this study.....	6
Chapter 2Materials and methods.....	7
2.1 Materials .....	7
2.2 Main instruments .....	7
2.3 Main regents .....	8
2.4 Solutions.....	8
2.4.1 The solutions for the detection of endocrine disrupting chemicals.....	8
2.4.2 The solutions forWestern blot.....	8



<b>2.5 Methods .....</b>	<b>9</b>
2.5.1 The detection of endocrine disrupting chemicals in serum .....	9
2.5.2 microarray analysis.....	11
2.5.3 Total RNA extraction.....	11
2.5.4 cDNA synthesization .....	12
2.5.5 PCR.....	12
2.5.6 DNA gel extraction.....	13
2.5.7 Realtime-PCR(qPCR) .....	13
2.5.8 Western Blot.....	14
<b>2.6 Data analysis .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapter 3 Results and analysis .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 The result of epidemiological investigations.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 The result of endocrine disrupting chemicals concentration in serum.....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Methodological study.....	18
3.2.2 The concentration of endocrine disrupting chemicals concentration in serum samples from controls and polycystic ovary syndrome patients.....	21
3.2.3 Spearman correlation between different endocrine disrupting chemicals .....	24
3.2.4 The correlation between epidemiological investigations result and endocrine disrupting chemicals concentration .....	24
3.2.5 Association between endocrine disrupting chemicals concentration and polycystic ovary syndrome from logistic regression analysis.....	26
3.2.6 The correlation between hormonal level, metabolic profile and endocrine disrupting chemicals concentration .....	26
3.2.7 Association between hormonal level, metabolic profile and endocrine disrupting chemicals concentration a from linear regression analysis .....	29
<b>3.3 Microarray analysis for exposed rats ovaries .....</b>	<b>36</b>
3.3.1 The statistics of differentially regulated genes .....	36
3.3.2 The analysis of biological processes and signaling pathway .....	38
3.2.3 The validity of the microarray results confirmed by qPCR.....	41
3.2.4 western blot analysis .....	42

<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 The concentration of endocrine disrupting chemicals .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Association between endocrine disrupting chemicals concentration and polycystic ovary syndrome .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Microarray analysis for TBT or BOA exposed rats .....</b>	<b>46</b>
<b>Chapter 5 Conclusions and outlook .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 endocrine disrupting chemical exposure and polycystic ovary syndrome ..</b>	<b>51</b>
5.1.1 Conclusions .....	51
5.1.2 outlook .....	51
<b>5.2 Sprague-Dawley rat exposure experiment .....</b>	<b>51</b>
5.2.1 Conclusions .....	51
5.2.2 outlook .....	52
<b>References .....</b>	<b>53</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>59</b>

## 摘要

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种在育龄妇女中常见的内分泌紊乱疾病,其常见特征为稀发排卵或少排卵、高雄激素血症、卵巢多囊化。PCOS 的发病机制尚不明确,而许多研究表明环境因素是导致 PCOS 发病的重要因素。

本实验收集育龄妇女流行病学资料,并利用气象色谱-质谱联用检测了 84 名 PCOS 患者及 94 名对照组血清中多种环境中内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)的含量。结合流行病学调查资料和相关激素代谢物质水平,利用逻辑回归和线性回归分析等统计学方法进行风险评估分析,并探讨 PCOS 可能的作用机制。另一方面,本研究以 SD 大鼠为实验对象,选取三丁基锡(tributyltin, TBT)作为典型类雄激素化合物代表,同时以典型类雌激素化合物双酚 A (bisphenol A, BPA)作为阳性对照,设置 TBT(10 ng/kg/d、100 ng/kg/d)、BPA(50 µg/kg/d)、BPA+TBT(TBT100 ng/kg/d+BPA50µg/kg/d)联合暴露组来探讨其毒性效应,利用基因芯片分析探讨 PCOS 的发病机制。

实验结果如下:

1、检测了 PCOS 患者及正常对照组血清中六六六(Hexachlorocyclohexane, HCHs)和滴滴涕(Dichlorodiphenyltrichloroethane, DDTs)的含量,其中 O,P'-DDT 的含量在 PCOS 患者组中显著高于对照组,而逻辑回归分析也发现 O,P'-DDT 在血清中的含量与 PCOS 有显著相关性。

2、血清中 O,P'-DDT 含量与结合卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、性激素结合球蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)成显著负相关,与 LH/FSH、睾酮、甘油三酯成显著正相关。线性回归分析也证明 O,P'-DDT 与上述激素和代谢水平有一定的线性关系。O,P'-DDT 可能通过调节激素水平的变化从而在 PCOS 发病机制中产生作用。

3、芯片结果分析显示,相比于 Control 组,各暴露组都有许多显著变化的基因,其中 TBT+BPA 联合暴露组显著变化基因数目远高于单独暴露组。qPCR 验证结果与芯片结果一致,表明芯片结果准确性。

4、对芯片结果的 GO 分析和 KEGG 分析显示, TBT 或 BPA 的暴露引起 PCOS 相关生物学过程和信号通路发生显著变化,而联合暴露组有最多的变化数目;其

中 PPAR 信号通路及 GnRH 信号通路中显著变化基因 Adcy2、Slc27a6、Aldh1a1 蛋白表达水平的检测结果与芯片结果一致，同时指出了 BPA 或者 TBT 影响这些信号通路的途径。

**关键词：**内分泌干扰物；多囊卵巢综合征；三丁基锡；双酚 A

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy in women of reproductive age, characterized with oligo-ovulation, hyperandrogenemia and polycystic ovarian morphology. The pathogenesis and etiology of PCOS is not clear. A large number of researches suggested that environmental factors have a role in the development of PCOS.

We collected epidemiological data of reproductive age women, and examined endocrine disrupting chemicals (EDCs) concentrations in 84 PCOS patients and 94 normal people serum by using Gas Chromatography-Mass Spectrometer. We used statistical analysis methods such as logistic regression and linear regression to analysis of risk assessment, and predicting the possible mechanisms of EDCs on PCOS by examining reproductive hormones and metabolites. We evaluated the toxicity of tributyltin (TBT) and bisphenol A (BPA, as a positive control) using Sprague-Dawley rat. Neonatal female rats were injected subcutaneously with BPA (50  $\mu\text{g/kg/d}$ ), TBT (10  $\text{ng/kg/d}$ ) and BPA (50  $\mu\text{g/kg/d}$ ) combined with TBT (10  $\text{ng/kg/d}$ ). We used microarray analysis to evaluate the pathogenesis mechanisms of PCOS.

Our results showed that:

1. Hexachlorocyclohexane (HCHs) and Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDTs) in serum of PCOS patients and controls were detected, and O,P'-DDT has a significant difference between PCOS and controls; The levels of O,P'-DDT in serum were also found significantly associated with PCOS by logistic regression analysis.

2. O,P'-DDT was negatively correlated with follicle-stimulating hormone (FSH) and sex hormone-binding globulin (SHBG), whereas positively correlated with luteinizing hormone (LH) /FSH, Testosterone (T), and triglyceride. They were also showed linear relationship in linear regression analysis. O,P'-DDT may play an important role in the pathogenesis by affecting the levels of reproductive hormones.

3. Microarray analysis suggested large sets of differentially regulated genes in rat ovaries in response to TBT or BPA exposure, and the TBT+BPA group had more regulated genes. The qPCR result shows that all the randomly selected genes displayed

a similar trend to the microarray data, thus confirming the validity of the microarray results.

4. The results of gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis indicated that the exposing of TBT or BPA cause some biological processes and signaling pathway related to PCOS, and the combined groups had more changes. The western blotting results of Adcy2(GnRH signaling pathway), Aldh1a1(PPAR signaling pathway), and Slc27a6(PPAR signaling pathway) show a similar trend to the microarray data, and indicated the influence ways of these pathways by TBT or BPA.

**Keywords:** Polycystic ovary syndrome; endocrine disrupting chemicals; tributyltin; bisphenol A

## 第一章前言

### 1.1 多囊卵巢综合征的现状与发病机理

#### 1.1.1 多囊卵巢综合征的主要症状和发病情况

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome, PCOS）是一种在育龄女性中常见的内分泌和代谢紊乱疾病，其主要特征表现为高雄激素血症、排卵功能障碍以及卵巢多囊化<sup>[1]</sup>。有大约 95% 的 PCOS 患者的卵泡早期会产生多囊卵巢结构并降低促卵泡激素水平<sup>[2]</sup>，从而有可能导致窦状卵泡生长停滞以及增加促黄体生成素的激素水平<sup>[3]</sup>。此外，PCOS 还与月经功能障碍以及胰岛素抵抗相关<sup>[4]</sup>。世界范围内育龄女性的 PCOS 发病率非常接近，约为 6%~10%。在美国育龄妇女中，PCOS 总体患病率为 6.6%，而黑人和白人女性的患病率分别为 8.0% 和 4.8%<sup>[5]</sup>。我国暂无确切的全国范围内育龄妇女 PCOS 患病率报导。

#### 1.1.2 多囊卵巢综合征的发病机理

PCOS 由于其病因极其复杂涉及各种激素调节和脂质代谢等，其发病机制尚不明确，现有的研究认为 PCOS 是由遗传和环境因素共同作用所引起的。一项研究表明有 46% 的 PCOS 患者的亲生姐妹会产生一些 PCOS 的症状<sup>[6]</sup>，而 PCOS 患者的直系亲属中胰岛素抵抗和内皮功能障碍的患病率会增加<sup>[7]</sup>。另一方面，环境因素在 PCOS 的发病中起到重要作用。日常生活方式和饮食习惯与 PCOS 患病之间有很高的相关性。与其他国家 PCOS 患者相比，美国 PCOS 患者有更加严重的代谢功能障碍，部分原因为其具有更大的体重以及饮食摄入中较高的脂肪含量<sup>[8]</sup>。日常生活中人们对工、农业所用原料、产品及排放的废弃物等的接触，是 PCOS 发病的重要因素<sup>[9]</sup>。环境内分泌干扰物（endocrine disrupting chemicals, EDCs）也可能会破坏卵巢和代谢功能，导致多囊卵巢综合征的一些症状。作为 EDCs 典型代表双酚 A（bisphenol A, BPA）在易感妇女体内的累积会使 PCOS 的一些症状严重化<sup>[10]</sup>。总而言之，PCOS 的病因是遗传和环境因素共同作用，其通过脂质代谢、激素调节、胰岛素合成分泌等一系列途径干扰内分泌系统，从而引起各类症状。

## 1.2 内分泌干扰物的种类和污染现状

在众多的环境污染物质中, EDCs 是一类能对人体造成严重影响的环境化学物质。环境中常见的 EDCs 包括: 大多数的有机氯农药(organochlorine pesticides, OCPs); 多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs)、多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)、BPA 等工业化合物; 部分重金属如锡、汞。其中 OCPs 的代表性物质是曾经大量使用的 DDT (dichlorodi-phenyltrichloroethane) 及其代谢产物 DDD (dichl-oro-diphenyldichloroethane)、DDE (dichlorodiphenyldichloroethylene) 和六六六 (hexachlorobenzene, HCH) 等。

EDCs 的来源极其广泛, 其中农业生产中农药的大规模使用会导致 OCPs 以及含有机锡的农药通过水和土壤进入生物循环, 而有机锡中的三丁基锡(tributyltin, TBT)作为轮船和码头的防污涂料还会直接进入水循环和生物循环; 电厂、冶金工业、化学工业和电子工业等会在生产过程中用到大量的 PCBs 等作为电气变压器和电容器流体绝缘体, 并且在排放过程中产生大量的 PAHs 和二噁英类物质, 这些污染源会通过水、土壤以及空气进入水循环、大气循环级生物循环; 被广泛应用于食品和饮料包装的 BPA 则直接与人体接触并通过饮食进入人体。一项研究在挪威的北方山地区土壤的剖面沉积层中也发现了 PCBs 和多溴二苯醚等不易挥发的 EDCs<sup>[11]</sup>, 说明大气循环是 EDCs 关键的全球传播机制, 而水循环和海流迁移则是许多极性 EDCs 的主要运输路线<sup>[12]</sup>。EDCs 大多数属于持久性有机污染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs), 是一种很难降解或者需要很长时间才能降解的污染物, 再加上其具有高度亲脂性, EDCs 通过食物链的累积和放大作用会在生物体内大量富集。

由于许多 EDCs 中 OCPs 的持久性以及对人体健康的影响, 从 20 世纪 70 年代开始, 大多数国家开始禁用或者严格限制生产大部分 OCPs, 但仍有部分被继续使用。例如 DDT 作为一种有效的杀虫剂, 从 1950 年到 1980 年间, 世界每年的使用量达到 4 万吨<sup>[13]</sup>, 至今为止总产量达到 180 万吨<sup>[14]</sup>。目前, DDT 被世界大多数的国家所禁止生产, 中国也于 2007 年彻底停止了 DDT 的生产, 但为了对抗疟疾等疾病, 仍有部分国家和地区在生产和使用, 印度是世界上最大的 DDT 生产和使用国家<sup>[15]</sup>。TBT 作为防污涂料添加剂, 可有效防止海洋生物对船舶、钻井平台、海洋建筑等的污损, 其上世纪在远洋轮船中的使用率曾达到 80%<sup>[16]</sup>,



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.